



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA

TÍTULO

**EFFECTO ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis*
L. “ROMERO” SOBRE CEPAS DE *Cándida albicans* ATCC10231
COMPARADO CON FLUCONAZOL**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO

AUTOR

LADY LAURA SOLANO ROJAS

ASESORES

DRA. MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ

MG. JAIME ABELARDO POLO GAMBOA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

Trujillo – Perú

2018

PÁGINA DEL JURADO

**Efecto antifúngico del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. "Romero"
sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC10231 comparado con fluconazol**



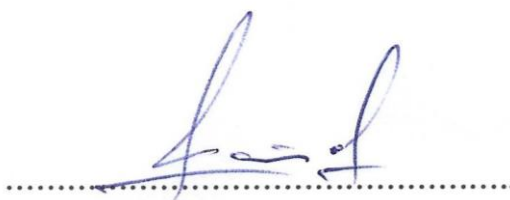
DRA. ANA MARÍA CHIAN GARCÍA

PRESIDENTE DEL JURADO



DRA. MARÍA DEL ROCÍO LLAQUE SÁNCHEZ

SECRETARIA DEL JURADO



MG. JAIME ABELARDO POLO GAMBOA

VOCAL DE JURADO

Trujillo, de diciembre del 2018

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más.

A mi madre por ser la persona que me ha acompañado durante todo mi trayecto estudiantil y de vida, quien ha velado por mí durante en este arduo camino para convertirme en una profesional.

A mi padre, a pesar de nuestra distancia física, siento que estás conmigo siempre y que con sus consejos ha sabido guiarme para culminar mi carrera profesional.

A mi hijo Drako quien estuvo durante toda mi carrera apoyándome incondicionalmente y ahora desde el cielo me iluminas, sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí , te amo infinitamente.

A mi hermana Michely quien durante estos años de carrera ha sabido apoyarme para continuar y nunca renunciar, por siempre estar dispuesta a escucharme y ayudarme en cualquier momento.

A mi hermano Antonio por ser un gran amigo para mí, que junto a sus ideas hemos pasado momentos inolvidables y uno de los seres más importantes en mi vida.

Lady Solano Rojas.

AGRADECIMIENTO

A mis asesores Dra. Llaque y Mg. Blgo. Jaime Polo por toda la colaboración brindada, durante la elaboración de esta tesis.

A la Universidad César Vallejo por ser mi alma mater, el lugar donde y aprendí y compartí muchas experiencias en toda mi vida universitaria

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de esta tesis.

Lady Solano Rojas.

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, **LADY LAURA SOLANO ROJAS** con DNI 46063698 , estudiante de la Escuela Profesional de Medicina Humana de la Facultad de Ciencias Médicas, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, declaro bajo juramento que todos los datos e información que acompañan a la Tesis titulada **Efecto antifúngico del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC10231 comparado con fluconazol en estudio in vitro** , son:

1. De mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas; por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido auto plagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

Lady Solano Rojas.

Trujillo, diciembre del 2018.

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: “Efecto antifúngico del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC10231 comparado con fluconazol en estudio in vitro”, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

La Autora.

ÍNDICE

	Pág.
PÁGINA DEL JURADO	i
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	iii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iv
PRESENTACIÓN	v
ÍNDICE	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Realidad Problemática:	1
1.2. Trabajos Previos:	2
1.3. Teorías relacionadas al tema:	4
1.4. Formulación del problema:	7
1.5. Justificación del estudio:	7
1.6. Hipótesis:	8
1.7. Objetivos	9
1.7.1. General	9
1.7.2. Específicos	9
II. MÉTODO	10
2.1. Diseño de Investigación:	10
2.2. Variables y operacionalización:	11
2.3. Población, muestra y muestreo:	12
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad: ...	13
2.5. Métodos de análisis de datos:	14
2.6. Aspectos éticos	14
III. RESULTADOS	15
IV. DISCUSIÓN	18
V. CONCLUSIONES	21
VI. RECOMENDACIONES	22
VII. REFERENCIAS	23
VIII. ANEXOS	26

RESUMEN

Se realizó un experimento in vitro para evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de la hoja del *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) comparado con fluconazol a la concentración de 25 µg, sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231. Se realizaron cuatro diluciones del aceite esencial (100%, 75%, 50% y 25%), fluconazol a 25 µg y un control neutro con DMSO; se realizaron 10 repeticiones por cada grupo de estudio. Se obtuvo que el aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L. muestra halos de inhibición a partir de la dilución al 75% 12,7 mm (DS \pm 1,7 IC 95% 10-15) al 100% 14.7 mm (DS \pm 1.3 IC 95% 16-19), valores no considerados como eficaces en relación al patrón del CLSI (>19mm), y no superan el halo de inhibición del fluconazol (25,8 mm DS: \pm 1.2 IC 95% 24 – 28). El análisis estadístico ANOVA indicó que los resultados del estudio fueron altamente significativos (0.000), al igual que la prueba de Tukey demostró que los grupos evaluados eran homogéneos y el grupo de fluconazol tenía mayor efecto antifúngico. Se observa que a mayor concentración del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, el halo de inhibición aumenta. Se concluye que el aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L. tiene efecto antifúngico sobre *Cándida albicans* ATCC 10231, pero menor que fluconazol, pudiendo ser utilizado como un medicamento coadyuvante en el tratamiento de *Cándida albicans*.

Palabra claves: Aceite esencial, *Rosmarinus officinalis* L., *Cándida albicans*

ABSTRACT

An *in vitro* experimental study was carried out to evaluate the antifungal effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) leaf compared to fluconazole at a concentration of 25 µg on strains of *Cándida albicans* ATCC 10231. Four dilutions of the essential oil were made, of 100%, 75%, 50% and 25%; fluconazole at 25 µg and a neutral control with DMSO; 10 repetitions were performed for each study group. The results for essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. leaf showed zones of inhibition for the dilution of 75% (12.7 mm DS \pm 1.7 IC 95% 10-15) and for the dilution of 100% (14.7 mm DS \pm 1.3 IC 95% 16 -19), values not considered effective in relation to the CLSI pattern (> 19 mm), and not exceeding the zone of inhibition of fluconazole (25.8 mm DS: \pm 1.2 IC 95% 24-28). The ANOVA statistical analysis indicated that the results of the study were highly significant (0.000), also the Tukey-test showed that the groups evaluated were homogeneous and the fluconazole group had a greater antifungal effect. It is observed that at higher concentration of the essential oil of *Rosmarinus officinalis*, the zone of inhibition increases. It is concluded that the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. leaf has an antifungal effect on *Cándida albicans* ATCC 10231, but less than fluconazole, and can be used as an adjunct medication in the treatment of *Cándida albicans*.

Keywords: Essential oil, *Rosmarinus officinalis* L., *Cándida albicans*

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Realidad Problemática:

El uso de fármacos en los procesos infecciosos, se ha incrementado alarmantemente y, con ello, la resistencia microbiana. Es conocido la gran demanda que tienen estos productos para inhibir o controlar la proliferación de los microorganismos patógenos humanos. Cada día abren sus puertas más establecimientos de venta de productos antimicrobianos, beneficiando a cadenas de farmacias y boticas¹.

Las infecciones en el humano por hongos son, mayormente, a nivel de piel y mucosas, siendo *Cándida albicans* uno de los más importantes agentes infecciosos fúngicos, especialmente en pacientes inmunodeprimidos. La candidiasis vulvovaginal (CVV) afecta entre 70 y 75% mujeres en edad fértiles y aproximadamente un 40 y 50% experimentará recurrencia. Desarrolla un cuadro más grave un 5 a 8% de las mujeres, la CVV recurrente (cuatro o más episodios de CVV al año). Aproximadamente 20% (10 a 80%) de mujeres sanas asintomáticas está colonizada por *Cándida*. La CVV continúa siendo un problema en el mundo pese a los avances terapéuticos, afectando a todos los estratos sociales¹.

Actualmente el tratamiento de elección de la CVV son los imidazoles intravaginales. Numerosos estudios experimentales indican que el fluconazol ha mostrado su eficacia mejorando la sintomatología de la CVV; asimismo, hicieron estudios comparativos de imidazoles administración intravaginal frente a orales, incluso en monodosis, observaron que en el tratamiento de CVV no complicada no existen diferencias significativas.

El tratamiento con agentes antimicóticos alternativos lo realizan de forma folclórica sin ningún criterio ni sustento científico. El clavo, canela, orégano, coco, pomelo, ajo, aloe, entre otros compuestos vegetales, son usados indiscriminadamente, sobre todo en situaciones en las cuales no puede usar

antimicóticos, como es la etapa gestacional. En algunos casos realizan combinación de dos vegetales, por ejemplo la manzanilla con la cola de caballo o el laurel con el romero.²

1.2. Trabajos Previos:

Tohshirova Z. (Rusia, 2016). Utilizó cepas de microorganismos: entre ellas *Cándida albicans*. El agar nutritivo al 1,5% era el medio de crecimiento, El régimen de control de la temperatura para todos los cultivos fue igual a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ dentro de 18-24 horas. Se utilizó como inóculo una suspensión de colonias de microorganismos cultivadas como tales, suspendida en una solución fisiológica hasta un mínimo de 0,5) y una concentración de 3,0 (máximo) mediante la escala de McFarland. Por lo tanto, el aceite esencial de *R. officinalis* L. tiene efecto antifúngico sobre *Cándida albicans*, Se obtuvo mediante escala de Mc. Farland una inhibición del crecimiento de microorganismos al $0.5\ 12 \pm 0.4\ \text{mm}$, al $3.0\ 9 \pm 0.7\ \text{mm}$.³

Vázcones G. (Ecuador, 2016), evaluó “*in vitro*” al extracto alcohólico y aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* como efecto antifúngico (EARO) en concentraciones al 25%,50%,75% y 100% sobre *Cándida albicans* cepa ATCC 10231. Obtuvieron halos de inhibición en promedio de 5,8 mm ; 15% de EARO,9,1mm al 20%,10,66 mm al 25%,11,83 mm al 50%,12,5 mm al 75%,14,73 mm al 100%,el aceite esencial generó un halo de inhibición de fue de 9,2 mm. Sin embargo se estudió que el que el aceite esencial es menos efectivo que extracto alcohólico a nivel fúngico y que ambas sustancias son potencialmente útiles en la terapia contra la candidiasis. ⁴

Rocha L. et al (Brasil, 2014). Estudiaron la actividad antifúngica de *Rosmarinus officinalis* L. en la formación de tubo anti-germinal. Se probó

el aceite esencial contra 4 cepas de *Cándida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, y *C. krusei*). Se obtuvieron tamaños de halo de inhibición y concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) usando dilución micro y pruebas de difusión radial. También se evaluó el efecto del aceite esencial sobre la formación de germoplasma en *C. albicans* y *C. dubliniensis*. La CIM osciló entre 0,5% y 2%, mientras que la MFC entre 1% y 2%. Se obtuvieron a partir de aceite esencial puro halos de inhibición grandes, que van de 39 a 47 mm lo que indica que es un antifúngico eficaz. Se obtuvieron halos de inhibición de aceite esencial al 8% oscilaron entre 9 y 13 mm, confirmando importante actividad anti-cándida de *R. officinalis* Linn, el aceite esencial mostró una actividad fungicida e inhibidora potente contra cepas específicas de *Cándida*.⁵

Shamal, et al.(Sudán, 2014). Hicieron un estudio en donde se evaluó extractos de éter de metanol, petróleo y agua de *Rosmarinus officinalis* a partir de las hojas en distintas concentraciones (25, 12,5 y 5%). La actividad más alta se demostró contra *Cándida albicans* y *Proteus vulgaris* en la concentración 25% (zona de inhibición 26, 23 y 21 mm respectivamente). *R. officinalis* produjo una zona de inhibición (20 mm) producida por extracto acuoso (25%) contra *Cándida Albicans*, desde este estudio preliminar del éter de petróleo, los extractos metanólicos y acuosos de *R. officinalis* detectaron su actividad antimicrobiana contra los patógenos *S. aureus*, *E. coli*, *Proteusvulgaris*, *S. Aeruginosa*, *C. albicans*. Exhibe acción antimicrobiana el extracto acuoso en distintas concentraciones contra todos los organismos que se han probado (excepto en un 5% la *P. Aeruginosa*).⁶

Márquez G. (Venezuela, 2012). Evaluaron la actividad antifúngica de los extractos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* L. contra especies del género *Cándida* aisladas en pacientes con vulvovaginitis. De 36

muestras tomadas, 12 resultaron positivas al cultivo micológico (33,33%), cuyas pruebas bioquímicas lograron identificarlas como *Cándida albicans* al 27,77%. Se logró obtener extractos de *Rosmarinus officinalis* L. usando etanol al 80,00%. La actividad antifúngica de los extractos se determinó colocando discos de papel impregnados con el respectivo extracto sobre placas de agar papa dextrosa (APD) previamente diseminadas con la suspensión de células levaduriformes. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se llevó a cabo mezclando 100 µl de los extractos en placas con micropozos que contenían, 100 µl de caldo Sabouraud dextrosa y 50 µl de la suspensión de células, ambos extractos presentaron propiedades antifúngicas sobre las especies del género *Cándida* aisladas. *Rosmarinus officinalis* produjo halos de inhibición de mayor diámetro sobre las cepas DB-Ca06 30,6mm , DB-Ca09 24,3 mm \pm 1.5 y la CMI del extracto acuoso se observó en su mayoría en la dilución 1:2,5 para las cepas de *Cándida albicans*, fue inhibida por este extracto a concentraciones de 11,2 mg/ml y 44,82 mg/ml.⁷

1.3. Teorías relacionadas al tema:

Rosmarinus officinalis L. pertenece a la familia *Labiaceae*, se distribuye en terrenos calcáreos y secos del Mediterráneo, frecuentemente cercanos a la costa asilvestrada en muchas zonas del mundo como especie de cultivo. Es un arbusto erecto, fragante, perenne y puede alcanzar los dos metros de altura es aromático y algo leñoso. Las hojas perennes, opuestas, coriáceas, lineales, revolutas, pequeñas y muy abundantes, tienen el margen arrollado y son de color verde oscuro aunque más pálidas por el envés. Las flores, agrupadas en racimos axilares o terminales presentes en todo el año, tienen una corola bilabiada, de color azul claro o blanquecina con tonalidades violeta. El labio superior tiene dos lóbulos en forma de casco, y el interior tiene tres. El fruto es un tetraquenio de color pardo.⁸

Contiene aceite esencial (pineno, canfeno, eucalipto, borneol acetato de bornilo, alcanfor de romero y cariofileno), ácido rosmarínico o ácido labiático, glucósidos flavónicos (pigmentos polifenólicos, derivados de la apigenina, genkwanina, diosmetina y luteolina), lactonas diterpénicas amargadas (picrosalvina o carnosol), derivados triterpénicos (ácidos ursólicos y oleanólico), alfa y beta-amirina, alcaloides (rosmaricina), colina, taninos, saponinas ácidas y vitamina C.⁸

Sobre los hongos el principal efecto de los imidazoles y triazoles es inhibición de la 14- α -esterol desmetilasa, un CYP microsómico, alterando la biosíntesis de ergosterol para la membrana citoplásmica y ocasionan la acumulación de 14- α -metilesteroles. Estos metilesteroles pueden deshacer el ensamble íntimo de acil cadenas de fosfolípidos y modificar las funciones de algunos sistemas enzimáticos ligados a la membrana e inhibir el desarrollo de los hongos.⁹

Un alto grado de hidrosolubilidad y penetración al líquido cefalorraquídeo es el fluconazol. Su alta biodisponibilidad oral de los compuestos azólicos tiene el índice terapéutico más amplio, permite una dosificación más intensiva en diversas infecciones micóticas. Se ha demostrado que intravenoso es equivalente a la anfotericina B para el tratamiento de la candidemia en pacientes de UCI con recuentos normales de leucocitos. Para el tratamiento de la candidiasis mucocutánea es el fármaco con mayor uso.¹⁰

Es un derivado bistriazol fluorado con actividad demostrada *in vitro* sobre *Cándida*, *Cryptococcus*, *Blastomyces*, *Cx) ccidioides*, *Paracoccidioides*, dermatofitos e *Histoplasma*. Tiene una excelente actividad contra *Cándida* spp., aunque *C. glabrata* es solo parcialmente susceptible Y *C. krusei* es resistente al fluconazol.¹¹

La micosis sistémica más común es la candidiasis y los agentes que la producen con mayor frecuencia son *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*. y *C. guilliermondii*. El amplio empleo de fluconazol ha desencadenado la aparición de más especies resistentes a azólicos, como *C. lusitaniae*. y *C. krusei*¹²

Lo que lo diferencia de otras especies de *Cándida*, la *Cándida albicans* es dimórfica; incluso de las formas de levadura y pseudohifas también produce hifas verdaderas. En medios de agar, a temperatura ambiental o en término de 24 h a 37°C, las especies de *Cándida* producen un olor a levadura con colonias blandas de color crema. ¹²

Los hongos de *Cándida* crecen como levaduras ovales o con forma de yema de 4 a 6 µm. La identificación de los hongos es basada en la combinación de características enzimáticas, morfológicas y bioquímicas. Menos de 10 de las 150 especies *Cándida*, ocasionan enfermedad en humanos. A diferenciación de otras especies la *C. albicans*, es la causa más común de enfermedad.¹³

C. albicans crece con diversas morfologías, más a menudo como levadura con gemación mediante la formación de blastoconidias. *C.albicans* también es capaz de formar hifas, lo que es estimulado por cambios en condiciones como la temperatura, pH y nutrientes celular de la levadura, estas hifas se denominan tubos germinales.¹³

La pared celular de *C. albicans* está constituida por una mezcla de polisacáridos de manano, glucanos y quitina sola o en complejos con proteínas. Una capa externa fibrilar se extiende desde la superficie y contiene varias glucoproteínas y complejos de manano con proteínas denominadas manoproteínas. La composición exacta de la pared celular y de los componentes de la superficie varía bajo diferentes condiciones de crecimiento.¹³

En condiciones normales la *C. albicans* es parte de la flora orofaríngea, gastrointestinal y del aparato reproductor femenino. Son endógenas las infecciones excepto en contacto directo de la mucosa con lesiones de otras personas por ejemplo en contacto sexual. Los dispositivos a permanencia y los procedimientos con penetración corporal posiblemente actúan como sitio de entrada para infección y puede incrementarse el número de microorganismos de *Cándida* disponibles con el uso de fármacos antibacterianos.¹³

C. albicans al invadir superficialmente las mucosas ocasiona una placa blanquecina, con apariencia de requesón, adhiriéndose en forma laxa a la superficie de la mucosa. Comúnmente la lesión es indolora, a menos que la placa se rompa y descubra una superficie invadida, cruenta y exudativa. Las lesiones orales, con apariencia de algodoncillo, se da en paladar, lengua y otras superficies de la mucosa, como múltiples placas o placa únicas, de bordes irregulares. En la vagina es una infección similar, la candidiasis vaginal, ocasiona viscosa leucorrea, con apariencia de requesón produciendo prurito de la vulva. Sin embargo, la mayoría de mujeres al menos una vez durante su vida ha presentado candidiasis vaginal y una minoría sufre infecciones crónicas, recurrentes.¹³

1.4. Formulación del problema:

¿El aceite esencial de la hoja del *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” tiene efecto antifúngico sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 comparado con fluconazol a 25 µg, en un estudio in vitro?

1.5. Justificación del estudio:

En todos lugares existió la posibilidad de contraer algún tipo de patógeno que pueda ocasionar alguna infección. Muchos de estos microorganismos estuvieron presentes en los lugares y sustratos que a diario frecuentamos.

Cándida albicans es uno de los patógenos que se ha estudiado mucho pero aun así, existió mucho más por conocer sobre este patógeno, especialmente a aquellas cepas resistentes a las drogas que se utilizaron para su control.

Por otro lado, existieron en la naturaleza muchos antifúngicos que sirvieron para *Cándida albicans* en el tratamiento de infecciones. Sin embargo, cada vez, esta desarrollaba resistencia o las personas fueron intolerantes a muchas drogas que se recomendaron para el tratamiento. Dando una mirada al entorno, la naturaleza nos ofreció vegetales que pudieron servir como una alternativa y en donde recayó la esperanza, en muchos casos.

Por ello, en este estudio se pretendió demostrar que algunos vegetales como el Romero, que tienen actividad antifúngica, puedan servir como alternativa para el tratamiento de algunas afecciones infecciosas por *C. albicans*. No se pretendió reemplazar a los antifúngicos de elección, sino demostrar que existieron componentes activos en el Romero que pueden servir como coadyuvantes.

Los resultados que se obtuvieron sirvieron para ratificar la buena eficacia del romero frente a *C. albicans*, siendo el primer paso la experimentación in vitro.

1.6. Hipótesis:

H1: El aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” tiene efecto antifúngico sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 comparado con fluconazol a 25 µg, en un estudio in vitro.

H0: El aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” no tiene efecto antifúngico sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 comparado con fluconazol a 25 µg, en un estudio in vitro.

1.7. Objetivos

1.7.1. General

Evaluar efecto antifúngico del aceite esencial de la hoja del *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” comparado con fluconazol a la concentración de 25 µg, sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231, en un estudio in vitro.

1.7.2. Específicos

- Estimar el efecto antifúngico del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L al 100%

- Estimar el efecto antifúngico del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L al 75%

- Estimar el efecto antifúngico del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L al 50%.

- Estimar el efecto antifúngico del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L al 25%.

- Estimar el efecto antifúngico del fluconazol sobre cepas de *Cándida Albicans* ATCC 10231.

II. MÉTODO

2.1. Diseño de Investigación:

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Básico

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Experimental: de series de tiempo con repeticiones múltiples, con post prueba.

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5
RG6	x6	O6

Donde:

RG₁₋₆: Grupos de cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231.

X₁: Aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. al 100%

X₂: Aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. al 75%

X₃: Aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. al 50%

X₄: Aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. al 25%

X₅: Control negativo (Suero fisiológico, DMSO)

X₆: Control positivo (Fluconazol 25µg)

O₁₋₆: Efecto antifúngico (halo de inhibición).

2.2. Variables y operacionalización:

V1: Tratamiento antifúngico para *Cándida albicans* ATCC 10231.

a. Tratamiento No Farmacológico:

Aceite esencial de la hoja del *Rosmarinus officinalis* L. (Romero).

b. Tratamiento Farmacológico: Fluconazol 25µg (Gold Estándar)

V2: Efecto antifúngico sobre *Cándida Albicans* ATCC 10231

Eficaz: zona de inhibición mayor que agente farmacológico: ≥ 19 mm

No eficaz: zona de inhibición menor que agente farmacológico: ≤ 19 mm

Operacionalización de variables:

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
Variable Independiente Esquema de tratamiento para <i>Cándida Albicans</i>	Para el tto de <i>C. Albicans</i> se utilizó: Tratamiento no farmacológico con <i>Rosmarinus officinalis</i> L. Tratamiento farmacológico con fluconazol ¹	La población fue dividida en los siguientes grupos: Aceite esencial de Romero al : a) 100% b) 75% c) 50% d) 25% e) Fluconazol f) Control negativo	RG1 RG2 RG3 RG4 RG5	Cualitativa nominal
Variable dependiente: Efecto antifúngico sobre <i>Cándida Albicans</i> ATCC 10231.	Acción de una sustancia que a partir de un triazol sintetiza una molécula con potencia antifúngica, disminuyendo su halo de inhibición, minimizando su liposolubilidad ² .	Medición del diámetro del halo de inhibición, de acuerdo al método de disco difusión en agar y tomando como referencia los estándares CLSI ¹⁵ . Diámetro de la zona de inhibición Sensible: ≥ 19 mm Resistente: 14 mm	Si efecto antifúngico: ≥ 19 mm No efecto antifúngico: ≤ 19 mm	Cualitativa Nominal

2.3. Población, muestra y muestreo:

POBLACIÓN: Estuvo conformada por todas las cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 que fueron cultivadas en el laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo.

MUESTRA:

Tamaño de muestra: La selección de la muestra se hizo considerando la fórmula estadística para comparación de dos medias y estimación de la diferencia que existe entre ellas, obteniéndose una muestra de 9 repeticiones por cada grupo de estudio (Anexo 1)¹³

Unidad de análisis: Se consideró a cada una de las cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231.

Unidad de muestreo: Estuvo constituida por cada una de las unidades formadoras de colonia de *Cándida albicans* ATCC 10231.

MUESTREO: Muestreo no probabilístico.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión:

- Cultivos puros de cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231.

Criterios de exclusión:

Cultivos de cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 inactivos o inertes las que no crecen.

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad:

Técnica: Se aplicó técnica de observación directa del crecimiento fúngico en la placa Petri de *Cándida albicans* ATCC 10231.

Procedimiento: (Anexo 02)

- A. Se hizo la identificación taxonómica de la planta de *Rosmarinus officinalis* L. en el Herbario del Departamento de Biología de la Universidad Nacional Agraria La Molina - LIMA
- B. Para la obtención del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. se utilizó método de extracción por arrastre de vapor de agua¹⁵, a partir del cual, se hizo las diluciones.
- C. La levadura *Cándida albicans* ATCC 10231 se cultivó en el medio de agar Sabouraud Glucosado¹⁶.
- D. La susceptibilidad del patógeno se evaluó según el método de disco difusión en agar, considerando lo establecido por el Estándar M44-A2 del CLSI.¹⁷

INSTRUMENTO: Se utilizó una ficha de recolección de datos elaborada para el presente estudio, considerando a las variables de estudio, de acuerdo con los criterios del Estándar M60 del CLSI.¹⁴ Se registra en la ficha: número de placa, las diluciones y controles positivo y neutro, los respectivos halos de inhibición por cada dilución. (Anexo 3)

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

La ficha de recolección de datos fue validada por opinión de tres profesionales de salud (médico y biólogos) quienes evaluaron la ficha de recolección de datos, y analizaron que cumpliera con recabar la información solicitada en la presente investigación. (Anexo 04).

2.5. Métodos de análisis de datos:

Los datos que se obtuvieron de las fichas de recolección de datos, tabulados en el programa Microsoft Excel 2013 y se sometieron a pruebas estadísticas en el Software estadístico SPSS v22. Se utilizó pruebas estadísticas para homogenizar la muestra y luego análisis de varianza (ANOVA), para evaluar la diferencia significativa entre los diámetros.

El análisis post ANOVA Tukey permitirán identificar la dilución con la que se obtendrá el mayor tamaño de halo de inhibición.

2.6. Aspectos éticos

El estudio se realizó respetando los criterios de bioseguridad del Ministerio de salud en el laboratorio con las personas y con el medio ambiente. Se consideró los protocolos de tratamiento de material potencialmente infeccioso y no exposición al peligro de las personas, según el “Manual de Bioseguridad en el Laboratorio” de la OMS.¹⁸

III. RESULTADOS

Tabla 1. Efecto antifúngico del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 comparado con fluconazol a 25 µg en estudio in vitro

DATOS DESCRIPTIVOS DEL ESTUDIO

Diámetro del halo de inhibición								
	N	Medi a	Desv. Desviaci ón	Desv. Error	Límite inferio r	Límite superi or	Mínim o	Máxim o
100 %	10	17.4 0	1.350	.427	16.43	18.37	16	19
75 %	10	12.7 0	1.767	.559	11.44	13.96	10	15
50 %	10	8.40	.699	.221	7.90	8.90	8	10
25 %	10	1.90	3.071	.971	-.30	4.10	0	7
Flucona zol	10	25.8 0	1.229	.389	24.92	26.68	24	28
Total	50	13.2 4	8.356	1.182	10.87	15.61	0	28

Fuente: Reporte de resultados SPSS versión 25

Tabla 2: Efecto antifúngico del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 comparado con fluconazol a 25 µg en estudio in vitro.

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3273.720	4	818.430	249.860	.000
Dentro de grupos	147.400	45	3.276		
Total	3421.120	49			

Fuente: Reporte de resultados del SPSS versión 25

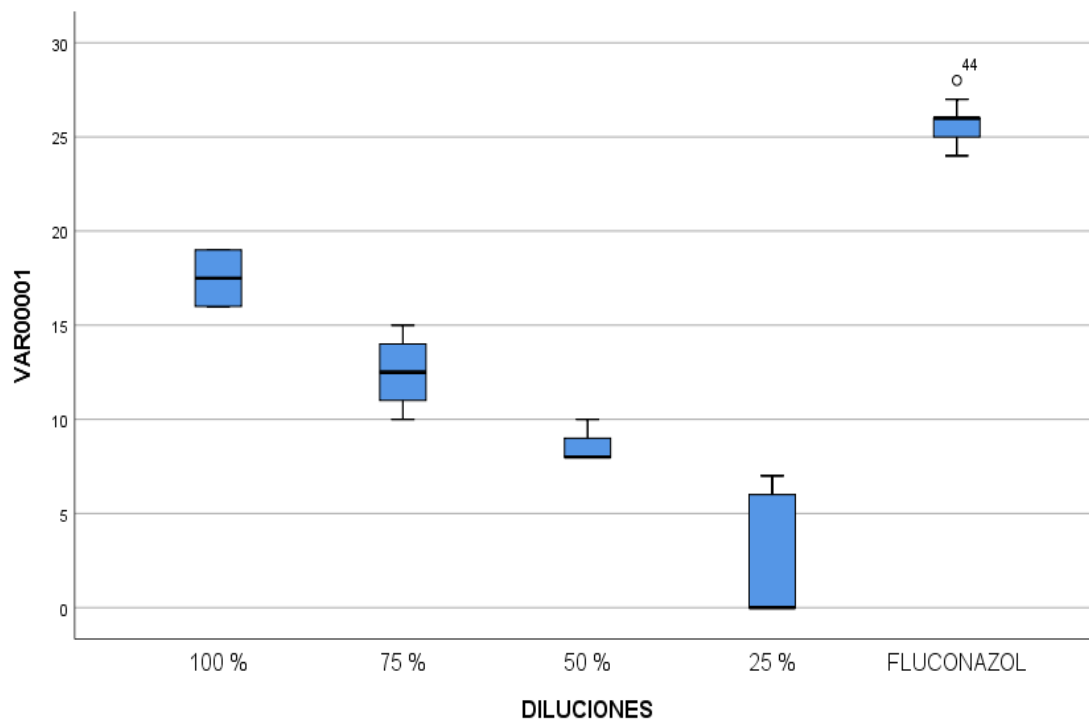
Tabla 3: Efecto antifúngico del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 comparado con fluconazol a 25 µg en estudio in vitro

Pruebas post-Hoc de Tukey						
HSD Tukey ^a						
DILUCION		Subconjunto para alfa = 0.05				
ES	N	1	2	3	4	5
25 %	10	1.90				
50 %	10		8.40			
75 %	10			12.70		
100 %	10				17.40	
Flucona zol	10					25.80
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10.000.

Fuente: Reporte de resultados SPSS versión 25



Fuente: Reporte de resultados SPSS versión 25

GRÁFICO 01: Efecto antifúngico del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 comparado con fluconazol a 25 µg en estudio in vitro.

IV. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 comparado con fluconazol a 25 µg, en un estudio in vitro. Para ello, se identificó el tamaño (19mm) de los halos de inhibición que se formaron como resultado de la actividad antifúngica que ejerció el aceite esencial de romero a cuatro concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) y el fluconazol (25 µg), sobre la levadura *Cándida albicans*, considerando los procedimientos recomendados por el CLSI.

Los resultados observados en la Tabla 1, indican que el fluconazol tuvo en promedio una mayor zona de inhibición del crecimiento de *Cándida albicans*, respecto a los obtenidos por las diferentes concentraciones del aceite esencial de romero. Sin embargo, el diámetro promedio de la zona de inhibición alcanzado por el aceite esencial de *R. officinalis* L. al 100% (17,40mm), este valor se considera que *Cándida albicans* es indiferente a este agente, según lo establecido por el estándar M60 del CLSI¹⁴ (≥ 19 mm). Las diluciones del aceite esencial de romero al 75%, 50% y 25%, actuaron sobre *C. albicans* dando valores que son considerados como resistente, a esas concentraciones.

La Tabla 02, refleja la evaluación estadística de los resultados e indican que el estudio fue estadísticamente altamente significativo (ANOVA 0.000). En la Tabla 03, la prueba Post Anova de Tukey nos muestra la homogeneidad de los grupos estudiados, así como la diferencia en relación al grupo que mostro mayor eficacia antifúngica; a partir de la dilución de 50% a 100% la eficacia del aceite de romero va aumentando, mostrando que tiene cierto grado de efecto antifúngico pero no supera a fluconazol.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, tienen valores mayores que los obtenidos por Vásconez⁴, encontró un halo de inhibición de 14,73 mm, con aceite esencial al 100%, no se consideró que *Cándida albicans* fuera sensible a esta dilución del aceite. En el trabajo de investigación realizado por Marquez¹⁹, se indica una gran variabilidad en los resultados de las 10 cepas de *C. albicans* estudiadas; cuyos halos de inhibición tuvieron como límite inferior a 8,3mm y límite superior 30,6mm, a diferencia del presente estudio que se obtuvo entre 17 mm y 19 mm como límite inferior y superior respectivamente. Tohsirova Z.³ él no evidencia acción antifúngica.

Asimismo, Fu et al²⁰, determinó que el efecto antifúngico del aceite esencial de romero tuvo una media de 21,5 mm DS. $\pm 1,5$ de halo de inhibición del crecimiento de *C. albicans*; mayor halo de inhibición que los obtenidos en el presente estudio. Rocha L.⁵ muestra halos de inhibición de 39 a 47 mm probablemente encuentra mayor halos de inhibición por encontrarse en Brasil porque estaría influyendo el terreno, el medio ambiente en relación a los compuestos del medio de la planta el medio de cultivo en relación a los componentes a la concentración que pueda estar teniendo esta planta.

De forma similar, Delić et al²¹ (Servia) encontraron diferencia significativa entre el efecto que tiene aceite esencial de romero sobre cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes y cepa ATCC 10231, encontraron halos de inhibición de 12,67 mm y 25,10mm para cada cepa, utilizando el mismo método de disco difusión para la prueba de susceptibilidad.

La diferencia que se puede observar de nuestros resultados con otros estudios se puede deber a que los componentes fitoquímicos varían de acuerdo al medio donde se cultivan las plantas y esto afecta su acción antifúngica o anti microbiana. Las diferentes zonas geográficas tienen

diferentes características del terreno, influenciados por la temperatura, humedad, altitud, entre otras que influyen sobre la riqueza de nutrientes en cada zona geográfica y esto determina la calidad de las plantas que se cultivan en los terrenos. Estos compuestos antimicrobianos son principalmente los polifenoles²², y dentro de ellos los que están en mayor cantidad en el aceite esencial de romero son piperitona, Linalol α -pineno, los cuales serían los responsables del efecto antifúngico contra *Cándida albicans*.²³

V. CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” tiene efecto antifúngico, sobre *Cándida albicans* ATCC 10231, *In vitro*, pero no supera la eficacia antifúngica del Fluconazol.
- En relación a las concentraciones se encontró que a mayor concentración el halo de inhibición va aumentando así al 100% el halo fue de 17 mm.
- Las concentraciones de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” al 75%, 50% y 25%, mostraron menor efecto antifúngico sobre *Cándida albicans* ATCC 10231.

VI. RECOMENDACIONES

- Se puede ampliar el estudio combinando el aceite esencial de romero con el fluconazol para potenciar el mayor efecto antifúngico.
- Se puede estudiar otras formas del extracto de romero como alcohólico, acuoso sobre hongos u otras bacterias Gram positivas o negativas.
- Se sugiere evaluar el efecto del aceite esencial de romero sobre *Cándida albicans*, en modelos roedores.

VII. REFERENCIAS

1. Tapia C. Candidiasis vulvovaginal. Rev Chil Infect [Internet]. 2008 [citado: 29 de abril 2017]; 25(4): 310-312. [Citado: 20 de setiembre 2016] Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v25n4/art16.pdf>.
2. Centro Andaluz de Información de Medicamentos CADIME. Vulvovaginitis por Candida: tratamiento. Vol Ter Andal [Internet]. Andalucía 2003 [Citado: 2 de mayo 2017]; 19(5): 17-20. Disponible en: http://www.cadime.es/docs/bta/CADIME_BTA2003_19_5.pdf
3. Tohsirova Z. ,Nikitina A. ,Popova O.STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTION OF ESSENTIAL OIL FROM STEMS OF ROSMARINUS OFFICINALIS L. (LAMIACEAE) . Medical and Pharmaceutical Institute branch of Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk .[Citado: 23 de junio 2017]; Disponible en : <https://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-antimikrobnogo-deystviya-efirnogo-masla-iz-pobegov-rozmarina-lekarstvennogo-rosmarinus-officinalis-l-lamiaceae>
4. Vázcones G .Efecto anti fúngico “in vitro” de aceite esencial y extracto alcohólico de Rosmarinus officinalis “Romero” sobre Candida albicans cepa ATCC 10231.[Citado: 11 de mayo 2017]; Disponible en : <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/3200>
5. Rocha L. et al. Antifungalactivity of Rosmarinus officinalis Linn. Essentialoilagainst Candida albicans, Candida dubliniensis, Candida parapsilosis and Candida krusei .[Citado: 11 de mayo 2017].Disponible en: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000100007

6. Shama IY, Abdullah AY, Adam KM, Aldai MA, Omer AM. In vitro Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* leave extracts. J. Agri-Food&Appl.Sci., Enero 2014; 2(1): 15-21.[Citado: 26 de junio2017].Disponible en: [http://www.blue-ap.org/J/List/1/iss/volume%202%20\(2014\)/issue%2001/4.pdf](http://www.blue-ap.org/J/List/1/iss/volume%202%20(2014)/issue%2001/4.pdf)
7. Márquez G. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Rosmarinus officinalis* (ROMERO) y *Melissa officinalis* (TORONJIL) CONTRA ESPECIES DEL GÉNERO *Candida*, AISLADAS DE PACIENTES CON VULVOVAGINITIS.[Citado: 11 de mayo 2017].Disponible en : <http://ri.bib.udo.edu.ve/handle/123456789/3625>
8. Berdones J. Gran enciclopedia de las plantas medicinales. España: MMX editorial Océano; 2015.
9. Laurence L., Bruce A., Björn C. Goodman&Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 12ª ed. México: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.; 2012.
10. Susan B., Anthony J. Katzung Farmacología Básica y Clínica. 12ª ed. México: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.; 2013.
11. Flores J. Farmacología humana. 6ª ed. España: Elsevier España, S.L. MASSON: 2014 .
12. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. 25ª ed. México: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.; 2011.
13. Kenneth J, George R. Sherris. Microbiología Médica. 5ª ed. México: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.; 2011.

14. CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 1st ed. CLSI Supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017
15. Peredo H. Palou E. López A. Aceites esenciales método de extracción. Temas selectos de ingeniería de alimentos. Journalplant. 2009 3-1. p24-32. [citado: 2017 May 22]. Disponible en: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
16. Britania Lab. Sabouraud Glucosado Agar. Argentina: Laboratorios Britania S.A.; 2015 [Citado: 11 de julio de 2018]. Disponible en: http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2971216486e.pdf.
17. CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. 2nd ed. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
18. Organización Mundial de la Salud – OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ra. Edición. Ginebra: Ediciones de la OMS; 2005.

VIII. ANEXOS

ANEXO 01

TAMAÑO MUESTRAL:

$$n = \frac{\left(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta}\right)^2 2\sigma^2}{\left(\bar{X}_1 - \bar{X}_2\right)^2}$$

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 2(1.5)^2}{(19 - 17)^2}$$

$$n = 8.82$$

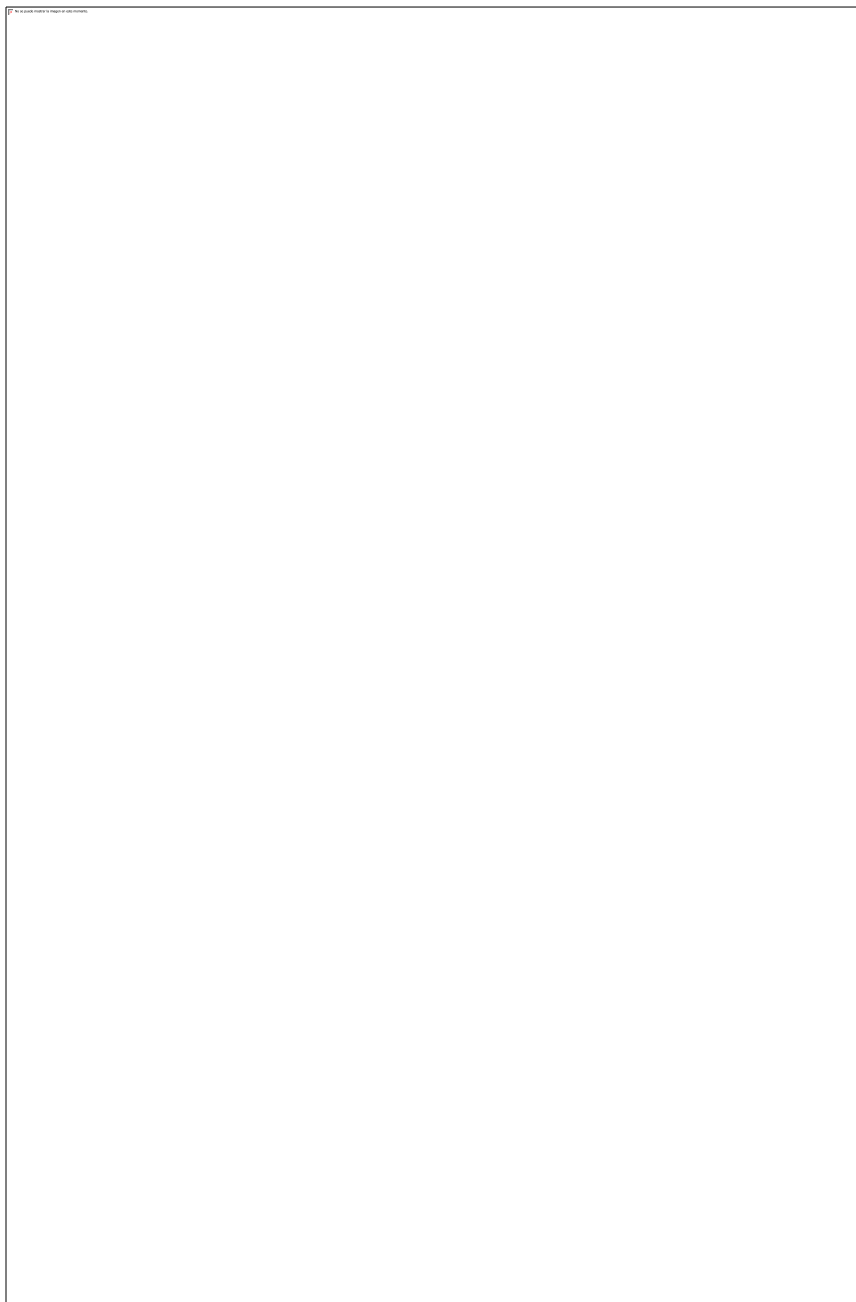
n = 9 se aumentó a 10 repeticiones.

Dónde:

- $Z_{\alpha/2} = 1.96$ Para un nivel de confianza del 95%
- $Z_{\beta} = 0.84$ para una potencia de prueba del 80%
- $\sigma^2 = \pm 1.5^6$
- $X_1 = 19 \text{ mm}^{14}$
- $X_2 = 17 \text{ mm}^5$

ANEXO 02

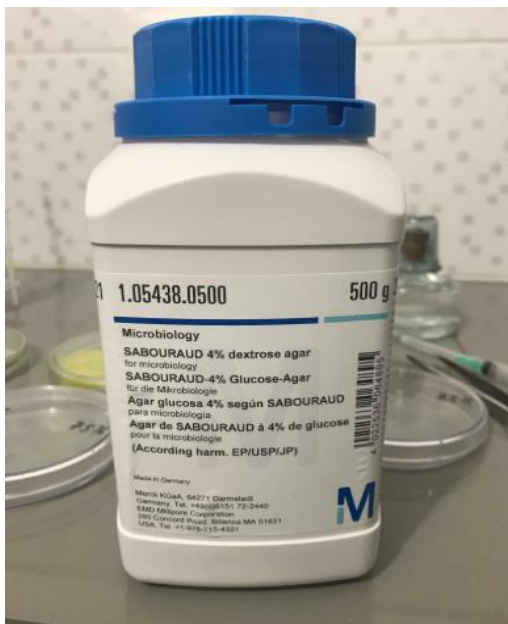
- A. Se hizo la identificación taxonómica de la planta de *Rosmarinus officinalis* L. en el Herbario del Departamento de Biología de la Universidad Nacional Agraria La Molina - LIMA



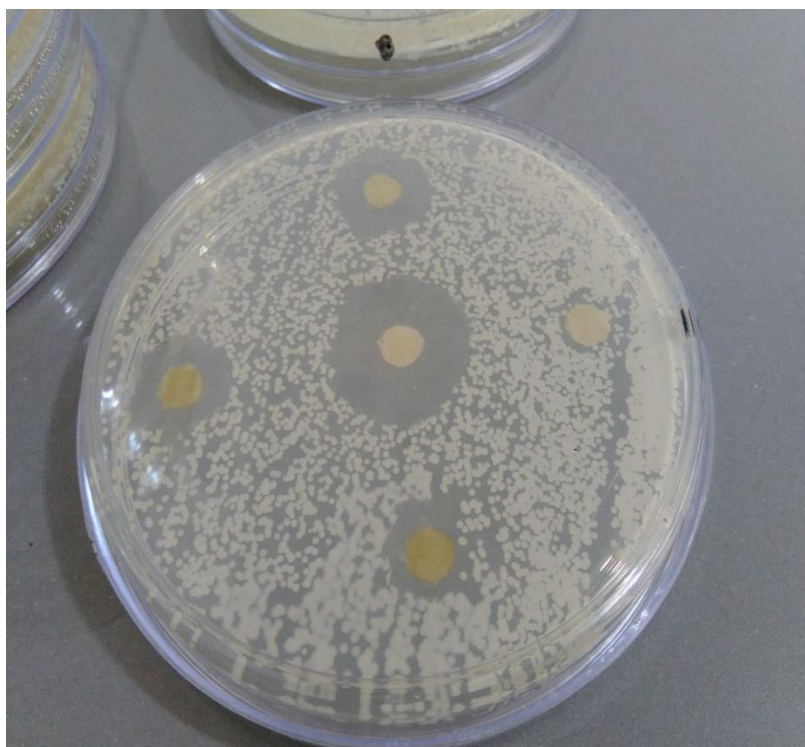
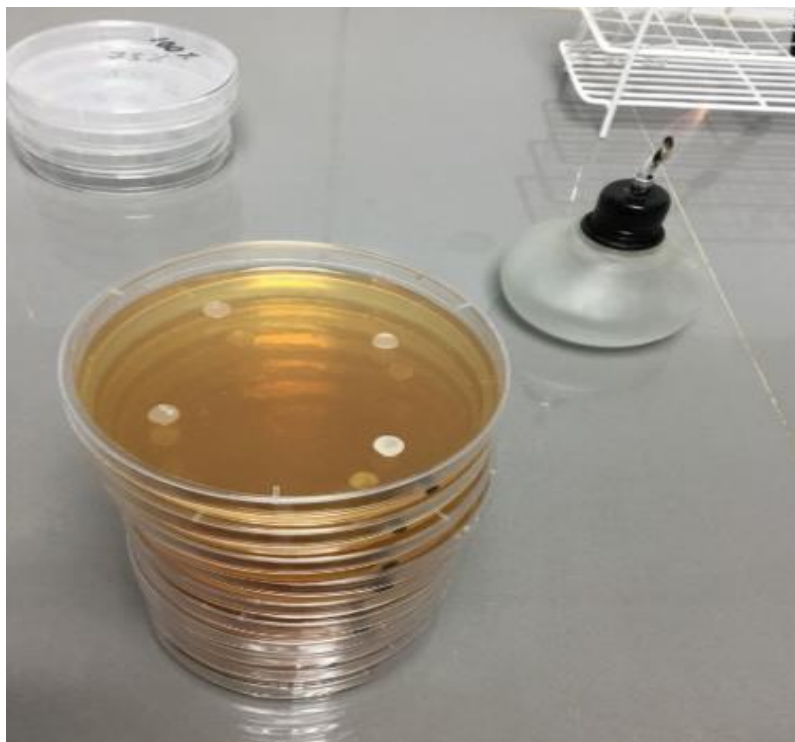
B. Para la obtención del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. se utilizó método de extracción por arrastre de vapor de agua¹⁵, a partir del cual, se hizo las diluciones.



C. La levadura *Cándida albicans* ATCC 10231 se cultivó en el medio de agar Sabouraud Glucosado¹⁶.



D. La susceptibilidad del patógeno se evaluó según el método de disco difusión en agar, considerando lo establecido por el Estándar M44-A2 del CLSI.¹⁷



PROCEDIMIENTO

1. Tratamiento de la planta

Las plantas frescas de *Rosmarinus officinalis* “romero”, procedente I vivero de la Universidad Nacional Agraria LA Molina (departamento de Lima, provincia de Lima , distrito de La Molina) se obtuvieron una cantidad de 6 Kg aproximadamente y se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionaron las hojas con buenas condiciones; de este modo, se obtuvo la “muestra fresca” (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada y se llevó a un horno a 40-45°C por 3-4 días donde se deshidrató. Después, se estrujaron manualmente las hojas secas hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservó almacenándolas herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró como “muestra seca” (MS).

2. Obtención del Aceite Esencial

El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* se obtuvo por el método de arrastre de vapor de agua; para ello, en un balón de 2 L se colocó 1,5 L de agua destilada y en un balón de 4 L se colocó la MS hasta que llenó las 3/4 partes del balón. Ambos balones se taparon herméticamente y estuvieron conectados a través de un ducto. Al mismo tiempo el B2 estuvo conectado a un condensador recto (refrigerante), el cual desembocó en un embudo decantador tipo pera. De tal modo que, el Balón con agua se calentó con una cocina eléctrica y el vapor de agua pasó a través del ducto hacia el Balón con la MS y arrastró los componentes fitoquímicos (incluido los lípidos). Este vapor se condujo hacia el condensador en donde se convirtió en líquido que fue recepcionado por el decantador tipo pera. Este líquido se disoció en dos fases, quedando el aceite en la superficie por diferencia de densidades. Este proceso se realizó en 2 horas. De este modo, se obtuvo el Aceite Esencial (AE) considerado al 100%; el cual se colocó en un frasco de vidrio ámbar y se reservó a 4°C hasta su utilización (no mayor a 8 días de preferencia).

3. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Sabouraud como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.

4. Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M44-A2 y M60.

a) Preparación del inóculo

El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Cándida albicans*, cultivado hace 18-20 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

b) Siembra del microorganismo

Se sembró el microorganismo *Cándida albicans*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.

c) Preparación de las concentraciones del AE

A partir del AE, se prepararon 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfóxido (DMSO); para ello, se rotularon 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4

concentraciones y se colocó 750 µL de AE y 250 µL de DMSO al tubo de 75%, 500 µL de AE y 500 µL de DMSO al tubo de 50%, y 250 µL de AE y 750 µL de DMSO al tubo de 25%.

d) Preparación de los discos de sensibilidad con AE

A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10 µL en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10 µL de AE al 25% y se colocó en un disco, 10 µL de AE al 50% en otro disco, 10 µL de AE al 75% en otro disco y 10 µL de AE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 10 veces.

e) Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con AE, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Cándida albicans*, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con Fluconazol (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.

f) Lectura e interpretación

La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de AE de *Rosmarinus officinalis* y para el Fluconazol. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M60 del CLSI.

CRITERIOS INTERPRETATIVOS DE HALO DE INHIBICIÓN Y CMI PARA
Cándida albicans

Tabla 15a.8. Puntos de corte y equivalencia diámetro-CMI para *Candida* spp. [1,3,11,15,23].

Antifúngico	Carga del disco	Diámetro (mm)			CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
		R	S-DD	S	R	S-DD	S
Fluconazol	25 μg	≤ 14	15 - 18	≥ 19	≥ 64	16 - 32	≤ 8
Voriconazol	1 μg	≤ 13	14 - 16	≥ 17	≥ 4	2	≤ 1
Caspofungina	5 μg	$\leq 10^*$	–	≥ 11	$> 2^*$	–	≤ 2

S, sensible. S-DD, sensible dependiendo de la dosis. R, resistente. *No sensible.

ANEXO 03

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Tabla 1. Diámetro de halos de inhibición en cultivos de *Cándida albicans* ATCC 10231, según agente antimicótico.

ZONA DE INHIBICIÓN (mm)						
Nº	Aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>				Fluconazol	DMSO
	100%	75%	50%	25%		
PLACA 1	16	14	8	0	25	0
PLACA 2	19	13	9	0	24	0
PLACA 3	18	15	8	6	26	0
PLACA 4	19	12	8	0	28	0
PLACA 5	16	11	8	6	24	0
PLACA 6	16	15	10	7	26	0
PLACA 7	17	10	8	0	26	0
PLACA 8	18	12	9	0	27	0
PLACA 9	16	14	8	0	26	0
PLACA 10	19	11	8	0	26	0

ANEXO 05

Comparaciones múltiples

HSD Tukey

(I) DILUCIONES	(J) DILUCIONES	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
100 %	75 %	4.700*	.809	.000	2.40	7.00
	50 %	9.000*	.809	.000	6.70	11.30
	25 %	15.500*	.809	.000	13.20	17.80
	FLUCONAZOL	-8.400*	.809	.000	-10.70	-6.10
75 %	100 %	-4.700*	.809	.000	-7.00	-2.40
	50 %	4.300*	.809	.000	2.00	6.60
	25 %	10.800*	.809	.000	8.50	13.10
	FLUCONAZOL	-13.100*	.809	.000	-15.40	-10.80
50 %	100 %	-9.000*	.809	.000	-11.30	-6.70
	75 %	-4.300*	.809	.000	-6.60	-2.00
	25 %	6.500*	.809	.000	4.20	8.80
	FLUCONAZOL	-17.400*	.809	.000	-19.70	-15.10
25 %	100 %	-15.500*	.809	.000	-17.80	-13.20
	75 %	-10.800*	.809	.000	-13.10	-8.50
	50 %	-6.500*	.809	.000	-8.80	-4.20
	FLUCONAZOL	-23.900*	.809	.000	-26.20	-21.60
FLUCONAZOL	100 %	8.400*	.809	.000	6.10	10.70
	75 %	13.100*	.809	.000	10.80	15.40
	50 %	17.400*	.809	.000	15.10	19.70
	25 %	23.900*	.809	.000	21.60	26.20

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Reporte de resultados SPSS versión 25

ANEXO 06

Constancia de Asesoría de Proyecto de Tesis



CONSTANCIA DE ASESORÍA DE PROYECTO DE TESIS

El que suscribe Jaime Polo Gamboa Docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académico Profesional de Medicina.

CERTIFICA:

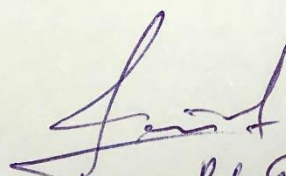
Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Proyectos de Tesis para obtener el Título Profesional Médico Cirujano, del alumno: Lady Laura Solano Rojas, de esta casa de estudios, está trabajando bajo mi asesoramiento el Proyecto de Tesis titulado:

Efecto antifúngico del aceite esencial de la hoja de Rosmarinus officinalis L. "Romero" sobre cepas de Cándida Albicans ATCC 10231 comparado con fluconazol en estudio in vitro.

Que será presentado para optar el Título anteriormente mencionado.

En tal virtud, asumo el asesoramiento de dicho proyecto, en calidad de Asesor TÉCNICO, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada para los fines académicos que estime conveniente, la Ciudad de Trujillo a los 12 días del mes de Diciembre de 2017


Jaime Polo Gamboa
CBP 6951

ANEXO 07

Constancia de Ejecución de Proyecto de Tesis



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO DE TESIS

El que suscribe, Jaime Polo Gamboa responsable del área de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas.

Hace CONSTAR

Que, el(la) estudiante LADY CAIRO SOCANO ROJAS de esta Superior Casa de Estudios, solicitó los ambientes de la Universidad César Vallejo para la ejecución de su Proyecto de Tesis. Por lo que, se le brindó todas las facilidades para que realice su trabajo de investigación experimental e hizo uso de los laboratorios, instrumental y equipos para ejecutar su Proyecto de Tesis titulado:

Efecto antipéptico del aceite esencial de la hoja de
Rosmarinus officinalis L. "Romero" sobre cepas de *Candida*
Albicans ATCC 10231 comparado con fluconazol en estudio
in vitro.

Utilizó el(los) laboratorio(s) de Microbiología desde el 03 de diciembre hasta el 15 de diciembre del año 2017.

Se expedido el presente a solicitud de la parte interesada sólo para fines académicos que estime conveniente.

Dado en la ciudad de Trujillo a los 27 días del mes de diciembre del año 2017.

Firma y sello:


Jaime Polo Gamboa
CBP 6951